THESIS MUNICH 1965

# Untersuchungen über die Brauchbarkeit einer Fraktion aus den Giften der Schlangen Bothrops jararaca und Lachesis atrox (Reptilase) als Haemostaticum

LANE MEDICAL LIBRARY OF
STANFORD UNIVERSITY
300 PASTEUR
PALO ALTO, CALIFORNIA

ANGELA EVA SCHOETZAU

Aus der I. Medizinischen Klinik der Universität München
Direktor: Prof. Dr. Herbert Schwiegk

# UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE BRAUCHBARKEIT EINER FRAKTION AUS DEN GIFTEN DER SCHLANGEN BOTHROPS JARARACA UND LACHESIS ATROX ( REPTILASE ) ALS HAEMOSTATICUM.

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Angela Eva Schoetzau
Hagen/Westf.

MÜNCHEN 1965

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

| | | |
|---|---|---|
| Referent: | Professor | Dr. R. Marx |
| Correferent: | " | Dr. H. Schwiegk |
| Dekan: | " | Dr. O. Hug |

Tag der mündlichen Prüfung: 13. 7. 1965

Meinen Eltern

in Dankbarkeit

gewidmet

## Inhalt.

Therapeutische Anwendung von Schlangengiften. 2
Einige Bemerkungen über die Bothrops jararaca und Lachesis atrox. 4
Bestandteile des nativen Giftes der Bothrops jararaca. 6
Isolierung der gerinnungsfördernden Substanz aus dem nativen Giftdrüsensekret der Bothrops jararaca. 7
Verschiedene Auffassungen über den Angriffspunkt der Schlangengifte - speziell der Haemokoagulase Klobusitzky - im Gerinnungssystem. 10
Klinische Erfahrungen mit Reptilase. 22
Eigene Untersuchungen:
Material. 28
Methoden und Versuchsergebnisse. 30
1. Bestimmung der Recalzifizierungszeit unter Zugabe von Reptilase. 30
2. Beeinflussung des Bothrops-jararaca-Gift-Präparates durch Tachostyptan. 32
3. Untersuchung der Reptilase auf eine Faktor V-Wirkung. 33
4. Wirkung des Haemostaticums auf die II. Phase der Blutgerinnung und Bestimmung seiner Thrombinaktivität. 34
5. Untersuchung einer Inaktivierung der Reptilase durch Thrombinhemmstoffe: Progressives Antithrombin, Heparin und Heparinoide, Hirudin. 35
6. Retraktion unter der Einwirkung der Haemokoagulase. 41
7. Löslichkeit der Reptilase-Gerinnsel in Harnstoff und Streptokinase. 42
8. Wirkung des Präparates auf die Thrombusfestigkeit. 44
9. Beeinflussung der Thrombocytenevolution durch das Haemostaticum. 47
10. Tierversuche. 48
Diskussion. 52
Zusammenfassung. 57
Literaturverzeichnis. 60

## Therapeutische Anwendung von Schlangengiften.

Schon in einer Zeit, in der noch die Auffassung herrschte, daß die Giftwirkung von Schlangen auf deren magischen Fähigkeiten beruhe, spielte Schlangengift in der Volksmedizin bereits eine Rolle. Seit Beginn dieses Jahrhunderts wurde es jedoch erst eingehenderen Untersuchungen durch die Schulmedizin unterzogen. Anlaß dazu gaben folgende Beobachtungen zweier amerikanischer Ärzte (16): In dem einen Fall wurde ein 35 Jahre alter Mann aus Texas nach 15jähriger Erkrankung an Epilepsie durch den Biß der Klapperschlange Crotalus adamantus von seiner Krankheit geheilt. Auf dieser Erfahrung basiert der Ausbau der Epilepsie-Therapie mit Crotalin. Zum andern berichtete der New Yorker Monaelessers über einen Leprakranken, der nach dem Biß einer Giftspinne schmerzfrei wurde. Daraufhin untersuchte man Schlangengifte auf eine ähnliche Wirkung und fand sie auch in der neurotoxischen Komponente mancher Gifte. Ihr Angriffspunkt liegt wahrscheinlich in den subcortikalen Zentren des Gehirns, dem Sitz des Schmerzzentrums (23), auf das sie dämpfend wirkt. Man nutzte diesen, den Opiumalkaloiden ähnlichen analgetischen Effekt, der besonders deutlich bei der Verwendung des Cobragiftes in Erscheinung tritt, bei der Behandlung von durch Tumoren hervorgerufenen Schmerzen aus. Die Wirkung tritt erst nach einer längeren Latenzzeit ein, ist allerdings auch von längerer Dauer als die des Morphins. Die Hoffnungen auf einen Rückgang von Tumorwachstum sind bisher nicht erfüllt worden.

Schlangengift hat sich auch bei der Behandlung von symptomarmen Tabesfällen als analgetisch wirksam erwiesen. Erfolgreich wird es ebenfalls in der Therapie von Arthrosen, Arthritiden und Myalgien angewandt. Vermutlich wirkt es hier Stoffwechsel verbessernd durch Steigerung der Blutzirkulation in dem erkrankten Gebiet. G R U N D M A N N (16) schreibt über die günstige Beeinflussung von akuter und chronischer Lumbago, Muskelrheumatismus, Polyarthritis humeroscapularis, rheumatischen Arthritiden, Arthrosis deformans, Neuritiden und Neuralgien durch Vipericin, das aus den Neurotoxinen der Giftschlangen Ceraster cornutus, Vipera berus und Lachesis muta hergestellt wird.

Daß in manchen Schlangengiften die Blutgerinnung fördernde Substanzen enthalten sind, hat bereits Fontana (20) im Jahre 1767 veröffentlicht. Der klinischen Therapie wurde diese Erkenntnis erst durch die beiden New Yorker Ärzte Peck und Frank (26) zunutze gemacht, die das Gift der Wassermokassinschlange in großen Verdünnungen als Haemostatikum bei Blutungen verschiedenster Genese gaben. Ihre Erfolge bei Haemorrhagien, Haemophilie, Thrombopenie und anderen Blutungsübeln waren sehr zufriedenstellend, so daß die Anwendung von Schlangengiften in den USA immer mehr Anhänger fand.

In der folgenden Arbeit beschäftigen wir uns mit der haemostatischen Wirkung der Gifte der brasilianischen Ottern Bothrops jararaca und Lachesis atrox, die besonders eingehend von D. v. Klobusitzky untersucht wurde.

## Einige Bemerkungen über die Bothrops jararaca und Lachesis atrox.

Die Einordnung der beiden Giftschlangen ins Tierreich erfolgt folgendermaßen:

K L A S S E : Kriechtiere (Reptilia)

O R D N U N G : Schlangen (Ophidia)

F A M I L I E : Grubenottern (Crotalidae)

Zur Familie der Crotaliden gehören die drei nahe verwandten

G A T T U N G E N : Klapperschlangen (Crotalus)
Lachesisschlangen (Lachesis)
Lochottern (Bothrops)

Beide Schlangen sind der Gruppe der Solenoglyphen, der Kanalzähner, zuzurechnen, die im Gegensatz zur Gruppe der Proteroglyphen, der Vorderfurchenzähner, relativ große, gut entwickelte, röhrenförmige Giftzähne besitzen. Diese sitzen an einem beweglichen Knochen vorne im Oberkiefer, so daß sie während des Bisses aufgestellt werden können.

Die Bothrops jararaca (=Schararaka ) (7) wird zwischen 1,40 m und 1,80 m lang. Von dem dünnen Halse setzt sich ein breiter, eiförmiger Kopf, der sich vor den Augen etwas verschmälert, in auffallender Weise ab. Dadurch daß das Rückgrat kielartig vorspringt, erscheint der mäßig schlanke Rumpf fast dreieckig. Der Schwanz ist kurz, dünn und zugespitzt. Charakteristisch sind Färbung und Zeichnung der Schararaka. Auf einem bräunlichgrauen, manchmal mehr ins Bläuliche, manchmal mehr ins Bräunliche gehenden Grund

sind jederseits dunkelgraue oder schwärzlich-braune große dreieckige Flecken gezeichnet, die einen dunkler werdenden Rand besitzen und am Grunde einen dunkel braungrauen Punkt zeigen. Am Schwanz bilden diese Flecken breite Querbinden. Die Grundfärbung des Bauches ist weiß. Seine Schilder tragen je zwei gräuliche Marmelflecke. Von der dunkleren Oberseite sind sie durch eine Reihe runder grau-brauner Flekken getrennt.

Die zweite Schlange - Lachesis atrox -, früher auch Labaria oder Bothrops atrox genannt, ist der Schararaka sehr ähnlich bezüglich Gestalt und Färbung. Der Bauch ist jedoch dunkler und jederseits durch ein paar Reihen weißer Fleckchen geziert. Auch in ihrer Lebensweise unterscheidet sie sich kaum von der ihr verwandten Lochotter.

Bestandteile des nativen Giftes der Bothrops jararaca.

Die Bothrops jararaca gehört zu den gefährlichsten Giftschlangen Brasiliens. Sie ist überall verbreitet, sowohl im trockenen Gebüsch als auch im feuchten Urwald.

Ihr natives Giftdrüsensekret enthält mehrere Substanzen mit verschiedenen Angriffspunkten:

1. ein Neurotoxin, das speziell am Nervensystem angreift und von D. v. Klobusitzky "Bothropotoxin" genannt wurde;
2. ein Haemolysin, das auf Lecithin-spaltende Fermente zurückzuführen ist;
3. eine gerinnungsfördernde Komponente, das "Bothropothrombin" nach v. Klobusitzky;
4. einen gerinnungshemmenden Stoff;
5. einen Faktor, der nach Roche e Silva und Mitarbeitern die Freisetzung von Bradikinin aus dem Plasma bewirken soll, was durch die plötzliche Blutdrucksenkung zum Auftreten von Schockzuständen führt.

In dem Gift der Bothrops atrox ist ebenfalls eine gerinnungsfördernde Komponente nachweisbar, die in allen ihren Eigenschaften denen des Bothropothrombins gleicht, so daß für sie dieselbe Bezeichnung gilt.

## Isolierung der gerinnungsfördernden Substanz aus dem nativen Giftdrüsensekret der Bothrops jararaca.

Wollte man den die Blutgerinnung fördernden Bestandteil des Jararaca-Giftes der Therapie von Blutungskrankheiten zugänglich machen, so mußte er erst isoliert und in möglichst reiner Form dargestellt werden, um unangenehme Nebenerscheinungen toxischer und allergischer Natur zu vermeiden. 1936 gelang es v. KLOBUSITZKY und KÖNIG (29), ihn gereinigt - jedoch nur in wässrigen Lösungen aus dem nativen Giftsekret der Schlange zu gewinnen.

Daß die gerinnungsaktive Substanz mit dem Neurotoxin nicht identisch war, hatten Arbeiten ergeben, bei denen ein stark wirksames Neurotoxin mit sehr herabgesetzter gerinnungsfördernder Wirkung isoliert werden konnte. Es galt nun, eine Substanz mit den entgegengesetzten Eigenschaften in die Hand zu bekommen.

V. KLOBUSITZKY und KÖNIG (25) arbeiteten nach folgendem Verfahren: Als Ausgangsmaterial nahmen sie eine Trockensubstanz, deren kleinste tödliche Dosis 0,27mg/Taube betrug, und stellten daraus 1,35%ige Lösungen her. Diese Stammlösung wurde mit Ammoniumsulfat in eine Albumin- und eine Globulinfraktion zerlegt. Die letztere zeigte eine weit größere gerinnungsfördernde Wirkung als die erste und wurde daher weiter gereinigt, indem die Globuline zunächst mittels Bleiazetat vorsichtig ausgefällt und die Salze nachher durch Dialyse entfernt wurden. Durch Vakuumdestillation oder Ultrafiltrieren wurden diese ferti-

gen Lösungen weiter eingeengt. Das auf diese Weise gewonnene aktive Prinzip nannte v. Klobusitzky "Haemokoagulase". Es zeigte im Vergleich zum nativen Gift folgende Unterschiede:

a) Es besaß keine gerinnungshemmende Eigenschaft.

b) Die Gerinnungszeit war auf die Hälfte jener, die als die kürzeste Zeit bei den nativen Lösungen beobachtet wurde, zurückgegangen.

c) Seine toxische Wirkung war $^1/_{11}$ - $^1/_{12}$ der Ausgangssubstanz.

Spätere Versuche H. M I C H L S (28) zur Auftrennung der einzelnen Komponenten des Schlangengiftes durch Papierelektrophorese ergaben die gleiche Wanderungsgeschwindigkeit für gerinnungsfördernden Bestandteil und neurotoxische Substanz. Der hämolysierende Faktor hingegen wanderte viel stärker zur Anode als jene. Der gerinnungshemmende Stoff wanderte in der mittleren Fraktion, die stark toxisch war, mit.

Die chemische Struktur des Bothropothrombins ist noch nicht aufgeklärt. V. K L O B U S I T Z K Y (26) nimmt an, daß es sich um ein Ferment handelt. Seine Adsorbierbarkeit, Thermolabilität, kolloidale Natur und Empfindlichkeit den sogenannten Fermentgiften gegenüber sprechen dafür.

Seit einiger Zeit befindet sich in Deutschland die Haemokoagulase unter dem Namen "Reptilase" im Handel. Sie wird aus dem getrockneten Schlangengift der beiden Ottern Bothrops jararaca und Lachesis atrox hergestellt. Sie soll

frei von Neurotoxinen und anderen toxischen Eiweißbestandteilen sein.

Reptilase ist auf Klobusitzky-Einheiten (K. E.) eingestellt. Eine K. E. entspricht einer gerinnungsfördernden Einheit, das ist diejenige Menge der gerinnungsfördernden Substanz, die 5 ccm 0,3%iges Natriumoxalat oder Natriumcitrat enthaltendes frisches Pferdeblut bei 20 - 22° C innerhalb von 9 - 10 Minuten zur vollständigen (harten) Gerinnung bringt. Diese Menge entspricht einer therapeutischen Dosis für Erwachsene. Bei der "in vivo" Testung am Versuchstier soll die Gerinnungszeit bei Gaben von 1/7 ccm des Präparates i.v. pro kg Körpergewicht auf mindestens 1/3 des ursprünglichen Wertes reduziert werden (26). 1 Ampulle Reptilase soll die normale Gerinnungszeit auf 1/2 - 1/3, die Blutungszeit durchschnittlich auf 1/4 des normalen Wertes herabsetzen. Ihre Wirkung soll bei subkutaner Injektion bis zu drei Tagen anhalten.

Das Präparat, das von der Firma Dr. Degen & Kuth, Düren-Rl. hergestellt wird, setzt sich folgendermaßen zusammen:

| | |
|---|---|
| Haemocoagulase | 1 K.E. |
| Natrium chloratum | 0,0085 g |
| Acidum carbolicum | 0,003 g |
| Gelatine | 0,002 g |
| Aqua bidestillata ad | 1,0 ccm. |

---

Der Fa. Dr. Degen & Kuth danken wir für die Überlassung von Versuchsmengen.

## Verschiedene Auffassungen über den Angriffspunkt der Schlangengifte - speziell der Haemokoagulase Klobusitzky - im Gerinnungssystem.

Über den genauen Angriffspunkt der gerinnungsfördernden Schlangengiftsubstanz der Bothrops jararaca gehen die Meinungen der Autoren weit auseinander. Die einen schreiben ihr eine Thrombokinase-ähnliche, die anderen eine Thrombin-ähnliche Wirkung zu.

E A G L E (13) teilt die die Blutgerinnung fördernden Schlangengifte in zwei Gruppen ein: einmal in die, welche wie Trypsin[1] und das Calcium-Plättchen-System die Umwandlung von Prothrombin in Thrombin hervorrufen, zum andern in solche, die wie Papain[2] und Thrombin direkt die Bildung von Fibrin aus Fibrinogen fördern. Er schreibt also die gerinnungsfördernde Fähigkeit der Schlangengifte in diesen vorhandenen proteolytischen Fermenten zu. Nach demselben Autor besitzt das Bothrops-jararaca-Gift die Thrombin- oder Papain-ähnliche Wirkung, da es unabhängig von der Gegenwart von Calcium-Ionen und Prothrombin eine gereinigte Fibrinogenlösung in ein fibrilläres Gel verwan-

---

1) Trypsin ist ein Eiweißspaltender Fermentkomplex (Proteasen). Es entsteht aus dem Trypsinogen der Pankreaszellen nach Aktivierung durch Enterokinase.

2) Papain ist eine im Milchsaft der Frucht von Carica papaya, dem mexikanischen Melonenbaum, vorkommende Protease.

delt,das sich aspektativ vom Blutfibrinthrombus nicht unterscheidet. Es zeigt aber auch eine Trypsin-ähnliche Wirkung, indem es - analog dem Thrombokinase-Calcium-System - Prothrombin zu Thrombin aktiviert. Diese Thrombinbildung soll durch Antithrombin verhindert werden, dagegen wird die direkte Wirkung des Giftes auf Fibrinogen durch Antithrombin nicht beeinflußt.

Untersuchungen Janszkys (21) sprechen auch für eine enge Beziehung zwischen koagulierender und proteolytischer Wirkung. Partielle Hitzeinaktivierung und anschließende Acetonfällung des Vollgiftes hatten eine gleichmäßige Aktivitätsabnahme zur Folge.

H O L T Z und R A U D O N A T (21) zeigten ebenfalls, daß an der gerinnungsfördernden Wirkung des Bothrops-Giftes zwei verschiedene Proteine beteiligt sind. Sie erhielten durch fraktionierte Fällung mit Ammoniumsulfat ein bei 60% iger Sättigung ausfallendes, nur schwach proteolytisches Koagulin mit Thrombin-ähnlicher Wirkung, die durch Heparin nicht gehemmt wurde, und eine bei 40% iger Sättigung ausfällbare Protease,die die Umwandlung von Prothrombin in Thrombin aktivierte und deren Wirkung durch Heparin aufgehoben wurde. Die Verfasser halten den Koagulinmechanismus auch für einen proteolytischen, da das Koagulin wie Thrombin aus Fibrinogen ein Polypeptid abspaltet und so die Gerinnung einleitet.

Die meisten Autoren stimmen darin überein, daß Calcium für die Bildung von Thrombin durch Thrombokinase-ähnliche

Gifte nicht erforderlich ist. Die Tatsache, daß Natriumoxalat und -citrat die Thrombinbildung hemmen, spricht gegen diese Annahme, und es ist durchaus möglich, daß durch die proteolytische Aktivität der Schlangengifte das für die Reaktion nötige Calcium aus Serumeiweißkörpern freigesetzt wird oder aber in den Giften selbst Calcium-Ionen enthalten sind.

Zusatz von Calcium führt jedenfalls zu einer wesentlichen Wirkungssteigerung der Reptilase. H A U P T (17) führt diese Gerinnungsbeschleunigung auf die Thrombokinasewirkung des Giftes zurück,was er durch den Ausfall des Prothrombinverbrauchstestes zu beweisen versucht. Setzte er einem FVIII-Mangel-Plasma Reptilase und Calcium zu, so trat die Gerinnung unter vollständigem Prothrombinverbrauch ein. Auch bei einem bloßen Zusatz von Reptilase ohne Calcium zu einem Hämophilie-A-Plasma betrug der Prothrombinverbrauch nach 3 Stunden 74%.

Ähnliche Versuche von B. B L O M B Ä C K , M. B L O M - B Ä C K und I. M. N I L S S O N (4) zeigten vollkommen entgegengesetzte Ergebnisse. Bei Zugabe von Reptilase und Calcium zu normalem und hämophilem Plasma war nach einer zwei Stunden langen Inkubationszeit bei 37°C der Prothrombinverbrauch gleich null. Dieselben Autoren konnten auch durch andere Experimente keine Wirkung der Reptilase auf die erste Phase der Blutgerinnung feststellen. Sie bestimmten die Recalzifizierungszeit von normalem Plasma nach Zusatz von Reptilase bzw Thrombinlösung entsprechender Konzentra-

tion. Die Verkürzung war in beiden Fällen gleich. Auch lief die Recalzifizierung von Hämophilie-Plasma, Plättchen-freiem Plasma und Prothrombin-freiem Plasma in Gegenwart von Reptilase nicht schneller ab als bei Zugabe einer äquivalenten Menge Thrombin. Die Einstufen-Prothrombinzeit dieser verschiedenen Plasmaarten wurde durch Reptilase nicht verkürzt.

D E U T S C H (11) schließt eine Wirkung auf die erste Phase der Gerinnung nicht ganz aus. Nach seiner Ansicht könnten die wesentlich kürzere Thrombinzeit mit Oxalatplasma als mit Fibrinogen als Substrat ebenso wie die starke Calciumwirkung mit Oxalatplasma für eine Thrombokinase-ähnliche Wirkung sprechen. Eine Thrombin-Ähnlichkeit scheint dadurch bewiesen, daß Reptilase reine Fibrinogenlösungen, Oxalatplasma, gelagertes und Seitzfiltriertes Plasma ohne Calcium-Zusatz zur Gerinnung bringt.

B. B L O M B Ä C K, M. B L O M B Ä C K und I. M. N I L S S O N (4) schreiben der Hämokoagulase Klobusitzky nur eine Wirkung auf die zweite Phase der Blutgerinnung zu. Nach ihren Angaben entspricht 1 ml einer unverdünnten Reptilaselösung einer Thrombinaktivität von 0,75 N. I. H. Einheiten.[1)]

---

1) 1 Thrombin-Einheit (N.I.H.-Einheit =National Institute of Health) ist diejenige Menge Thrombin, die 1ccm einer standardisierten Fibrinogenlösung in 15 ± 0,5 Sekunden bei 28 ± 1,0°C zur Gerinnung bringt.

Man nimmt an, daß die durch Reptilase katalysierte Umwandlung von Fibrinogen zu Fibrin ein proteolytischer Vorgang ist und im Prinzip so abläuft, wie das mit reinem Thrombin der Fall ist. Dabei soll von dem Fibrinogen zunächst ein Fibrinopeptid abgespalten werden, wodurch das Fibrinogen seine elektrische Ladung ändert und auf diese Weise aktiviert wird; anschließend polymerisiert es, und es kommt zur Ausbildung des unlöslichen dreidimensionalen Fibrinnetzes.

H A U P T (17) bezweifelt eine direkte Fibrinogenumwandlung in vivo durch Reptilase, wenn er auch denselben Vorgang in vitro nicht abstreiten kann. Seine Argumente sind folgende: Wenn das Präparat eine für die Blutgerinnung ausreichende Thrombin-Wirkung auf das Fibrinogen hat, so müßte es während der intravenösen Injektion zur intravasalen Gerinnung kommen. Würde aber ein verdünntes Präparat langsam gespritzt, so käme es zu einer feinflockigen Fibringerinnung mit Defibrinierung und folgender Ungerinnbarkeit des Blutes, wie es aus Tierversuchen mit Thrombinlösungen bekannt ist. Eine gerinnungsfördernde Wirkung der Reptilase bei einer Verdünnung von 1 : 16 konnte Haupt in eigenen Untersuchungen nicht mehr feststellen. Außerdem sprechen die in der Literatur angegebenen unsicheren Erfolge mit Reptilase bei durch Thrombokinase-Bildungsstörungen hervorgerufenen Blutungen gegen eine direkte Reptilase - Fibrinogen - Wirkung. Die Thrombin- und Thrombokinase-ähnlichen Eigenschaften erklärt Haupt durch ein Eingreifen in

den autokatalytischen Prozeß der Gerinnung, indem durch die Thrombokinase-ähnliche Wirkung Thrombinspuren aus Prothrombin freigesetzt werden, welche genügen, um eine autokatalytische Wirkung auf die Blutthrombokinasebildung auszuüben, die durch die Thrombin-ähnliche Eigenschaft der Reptilase direkt und durch ihre Hemmwirkung auf Antiblutthrombokinase indirekt unterstützt wird.

Außerdem schreibt Haupt der Reptilase noch eine geringe Prothrombin- und FVII-Wirkung zu, der allerdings keine große Bedeutung beigemessen werden dürfe.

Die neuesten Arbeiten von L. N A H A S, K.W.E. D E N - S O N und R.G. M A C F A R L A N E (32) über die koagulierende Wirkung verschiedener Schlangengifte zeigten folgende Ergebnisse: Die Gifte der Bothrops jararaca und Bothrops atrox sollen ähnlich wie das Gift der Russell-Viper mit FX, FV, Phospholipid und ionisiertem Calcium einen sehr wirksamen Prothrombinaktivator bilden, der die Prothrombinumwandlung wesentlich beschleunigt. Wurden die Gifte mit spezifischem Antiserum inkubiert, so verloren sie diese Wirkung. Wurden sie jedoch zunächst mit FX und Calcium zusammengegeben, so bildete sich ein wirksames Produkt,das bei späterem Hinzufügen des Antiserums nicht mehr inaktiviert wurde und so seine Prothrombin umwandelnde Wirkung voll entfalten konnte.

Die Analyse der endständigen Aminosäuren (6) des durch Reptilase bzw Thrombin gebildeten Fibrins aus Rinderfibrinogen zeigte eine qualitative Ähnlichkeit in der Wir-

kungsweise beider gerinnungsfördernden Fermente, indem die Glutamylreste des Fibrinogens verschwanden und durch Glycylreste im Fibrin ersetzt wurden. Außerdem enthielten sowohl das Fibrinogen als auch das Fibrin in gleichen Mengen Tyrosin als endständige Aminosäure. Quantitativ waren jedoch Unterschiede nachweisbar, welche eine verschiedene Spezifität der beiden Enzyme widerspiegeln. Das molare Verhältnis von Tyrosin zu Glycin war nämlich im Reptilase-Fibrin 1:1, im Thrombin-Fibrin dagegen 1:2.

B L O M B Ä C K und W E S T E R M A R K (3) isolierten 1958 chromatographisch 2 Peptide, die aus Rinderfibrinogen durch Rinderthrombin freigesetzt worden waren. Das eine Peptid enthielt endständige Glutaminsäure, das andere dagegen besaß keinen endständigen Aminosäurerest, dafür enthielt es jedoch mit Schwefelsäure verestertes Tyrosin. Diese beiden Peptide schienen mit denen von Bettelheim und Bailey 1952 durch Elektrophorese isolierten identisch zu sein. Sie wurden Peptid A und Peptid B genannt. B L O M B Ä C K (3) untersuchte die proteolytische Wirkung von Reptilase auf Rinderfibrinogen. Er fand, daß durch diesen Stoff nur das Peptid A freigesetzt wird. Dieses zeigte wie das durch Thrombin abgespaltene A-Peptid Glutaminsäure als endständige Aminosäure. Vermutlich ist die Freisetzung dieses Peptids aus Fibrinogen für die folgende Polymerisation unbedingt nötig. Die Abb. 2 zeigt ein Chromatogramm der aus dem Gerinnsel ausgepressten Flüssigkeit nach einer 185 Minuten langen Inkubation von Fibrinogen mit Reptilase.

Bei dem zweiten Gipfel der diphasischen Kurve kann es sich möglicherweise um das Peptid B handeln. Seine Freisetzung erfolgt jedoch sehr langsam und nur in geringem Maße.

Die durch die Thrombin-ähnlichen Schlangengifte entstandenen Gerinnsel fallen durch ihre geringere Konsistenz und Elastizität auf als die durch das physiologische Gerinnungsferment gebildeten. Ob das auf einen unterschiedlichen Vernetzungsvorgang zurückzuführen ist oder auf das Vorhandensein fibrinolytischer Fermente, ist unklar. Nach B. BLOMBÄCK, M. BLOMBÄCK und I. M. NILSSON (4) zeigt Reptilase allerdings weder eine Plasmin-, noch eine Plasminogen-ähnliche oder Plasminogen-aktivierende Wirkung. Das Schlangengift-Fibrin läßt sich auch trotz Anwesenheit von Serum und Calcium-Ionen in einer 50%igen Harnstofflösung auflösen, während das durch Thrombin gebildete Fibrin sich bei Vorhandensein von Serum infolge eines sogenannten "Fibrinstabilisierungsfaktors" nicht mehr in Harnstoff auflöst. Janszky (20) schließt daraus auf einen unterschiedlichen molekularen Aufbau der makroskopisch gleich erscheinenden Gerinnsel. Vermutlich sind Polymerisationsgrad und Art der Querverbindungen in den durch Thrombin und Reptilase gebildeten Fibrinmolekülen verschieden.

Weitere Versuchsergebnisse sprechen gegen eine Identität der Reptilase mit Thrombin.

HOHNEN (20) zeigte, daß Reptilase Hitze gegenüber bedeutend weniger empfindlich ist als Thrombin. Während das

letztere bereits nach kurzem Erhitzen auf 56°C weitgehend inaktiviert wird, beginnt Reptilase erst ihre Wirkung nach 10 min langem Erhitzen auf 70°C langsam zu verlieren, ist aber auch nach 10 min langem Erhitzen auf 100°C noch nicht völlig inaktiv, sondern hat nur eine Gerinnungszeitverlängerung um das dreifache zur Folge.

Das Verhalten der Haemokoagulase Thrombininhibitoren gegenüber wird von den verschiedenen Autoren unterschiedlich beurteilt.

V. K L O B U S I T Z K Y (27) spritzte Kaninchen 1/70 gerinnungsfördernde Einheit Reptilase pro kg Körpergewicht, bestimmte vorher und 1/2 Stunde nachher die Gerinnungszeit der Tiere und injizierte ihnen anschließend ein Heparinpräparat (Liquémine) in verschiedenen Konzentrationen. Der Versuch ergab, daß 100 I. E. Heparin in allen Fällen die Reptilasewirkung aufhob. 7 000 I. E. Heparin sollen notwendig sein, um eine Klobusitzky-Einheit sicher zu neutralisieren.

Auch H A U P T (17) nimmt einen gewissen Heparinantagonismus der Reptilase an,der allerdings erst bei sehr hohen Dosen (2 500 E/ml Reaktionsgemisch) in Erscheinung tritt.

Eagle machte die Beobachtung, daß bei Hunden im anaphylaktischen Schock entstandenes Antithrombin speziell auf Thrombin wirkt,die gerinnungsfördernde Fähigkeit der Thrombin-ähnlichen Schlangengifte jedoch nicht beeinflußt. D E U T S C H (11) und H O H N E N (20) konnten gleichfalls - auch bei Anwendung hoher Heparindosen - keinen Heparin-

antagonismus feststellen. Auch die Untersuchungen von Blombäck und Nilsson zeigten im Verhalten der Reptilase Antithrombin gegenüber einen Unterschied zum Thrombin. Sie wurde weder durch Heparin + Cofaktor noch durch Plasma-Antithrombin inaktiviert.

Trotz dieser sich oft widersprechenden Versuchsergebnisse der verschiedenen Verfasser spricht vieles dafür, daß die Reptilase zumindest eine Thrombin-ähnliche Wirkung hat. Den besten Beweis lieferten die Versuche Sherrys und Trolls und später die von H O H N E N (20) und B L O M B Ä C K, B L O M B Ä C K und N I L S S O N (4), die zeigten, daß beide Fermente das synthetische p-Toluol-sulfonyl-L-Argininmethylesterhydrochlorid (=TAMe) in Toluol-sulfonyl-arginin und Methanol spalten können, auf Lysin-, Glycin- und Tyrosinester jedoch keine proteolytische Wirkung haben. Thrombin und Reptilase scheinen somit auf Argininester spezifisch zu wirken. Gerinnungsphysiologisch besteht allerdings insofern ein Unterschied, als die gleiche Thrombinkonzentration, die sich in der esterspaltenden Wirkung wie Reptilase verhält, Fibrinogenlösungen und Citratplasma bedeutend schneller zur Gerinnung bringt als Reptilase.

Als letztes wäre noch eine gewisse gefäßabdichtende Wirkung der Haemokoagulase zu diskutieren. S T A C H E R und B Ö H N E L (36) untersuchten mit Hilfe des Landis-Testes die Gefäßpermeabilität vor und nach Reptilase-Applikation an Patienten, bei denen auf Grund ihrer Erkrankung eine erhöhte Gefäßdurchlässigkeit zu erwarten war. Sie stellten

mit dem angewandten Verfahren in allen Fällen eine Abdichtung der Gefäße fest; der Protein- und Flüssigkeitsverlust waren erheblich geringer als vor der Injektion des Haemostypticums. Eine hypothetische Erklärung für diese Wirkung wäre, daß das Schlangengift in geringer Konzentration die Bildung der endothelialen Schicht des nicht gelförmigen Fibrins ( C O P L E Y (10) ) fördert und so die Gefäße abdichten hilft. Nach M A R X ist dies sehr wenig wahrscheinlich.

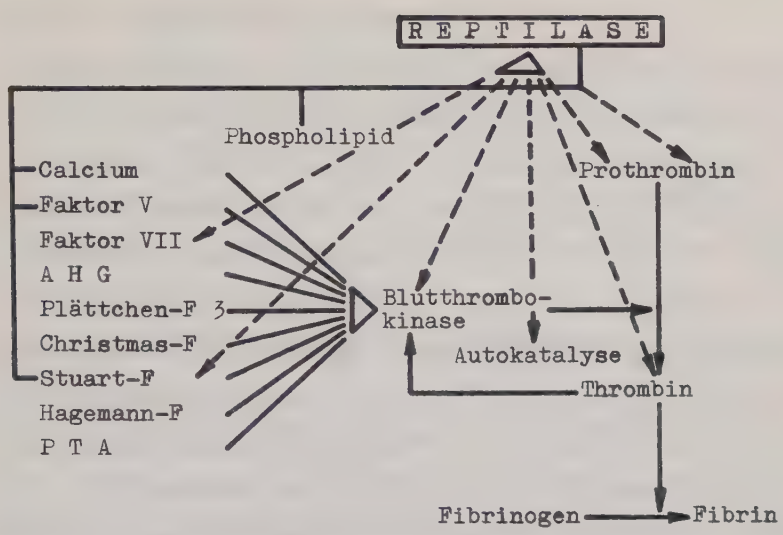


Abb.1: Die im Text dargestellten möglichen Angriffspunkte der Reptilase im Blutgerinnungssystem.

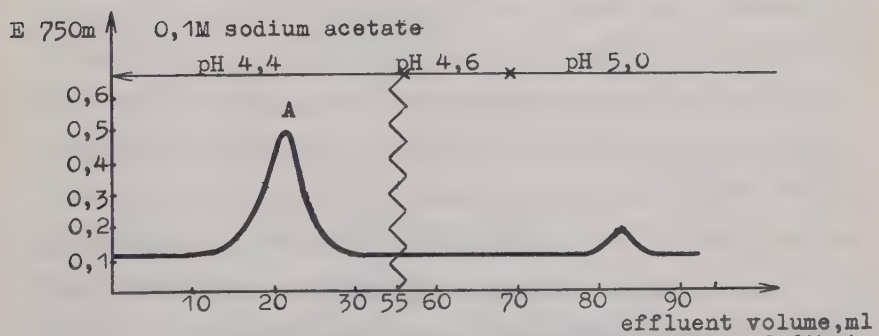


Abb.2: Appearance of peptide A after incubation of fibrinogen with snake venom enzyme. Chromatography on Dowex-50×2 of clot supernatant after 185 minutes incubation with Reptilase. (Aus der Originalarbeit von Blombäck (3) )

## Klinische Erfahrungen mit Reptilase.

Reptilase kam bisher bei Blutungen verschiedenster Genese zur Anwendung. So wurde es zur Stillung parenchymatöser Blutungen bei Ulcerationen des Magens, bei Haematurie, Schleimhautblutungen im Nasen- und Kieferbereich (12), bei Lungen- (35) und Hirnblutungen (24,30,37) und bei Blutungen aus Haemorrhoiden und Oesophagusvarizen gegeben. Auch haemorrhagische Diathesen bei Haemophilie, Thrombopenie und Hypoprothrombinaemie sollen mit dem Haemostaticum zum Teil erfolgreich behandelt worden sein. Gynäkologische und geburtshilfliche Indikationen (1,19) zur Verabreichung von Reptilase waren Laparotomien bei Extrauteringravidität, Cysten, Myomen und Ovarial-Carcinomen, Sectio caesarea, außerdem Blutungen nach Cürettage und gynäkologischen Untersuchungen, Abortus imminens und selbst hormonelle Blutungen.Hauptanwendungsgebiet sind jedoch chirurgische Operationen.So wurde Reptilase ante operationem zur Minderung des operativen Blutverlustes und zur Schaffung eines blutarmen Operationsfeldes und bei Blutungsgefahr als postoperative Nachbehandlung injiziert. B R U C K (8) gibt als Indikationen für die Prophylaxe mit Reptilase ambulante Operationen zur Vermeidung eines postoperativen Haematoms und plastische Operationen an,bei denen neben der Infektionsgefahr die Nachblutung die am meisten gefürchtete Komplikation darstellt.

Die Dosierung des Haemostaticums beträgt für Erwachsene 1 K.E., das ist 1 ccm Reptilase,für Früh-, Neugeborene und

Kleinkinder 0,3 - 0,5 ccm.

Die verschiedenen Arten der Reptilase-Applikation sind subcutane, intramuskuläre, intravenöse und submuköse Injektion, letztere z.B. in die Umschlagfalte des Ober- oder Unterkiefers bei hartnäckigen Blutungen im Kieferbereich. Zur lokalen Blutstillung dienen Reptilase-Mull und Reptilase-Streifen zur Tamponade.

Die intravenöse Applikation unterscheidet sich von der subcutanen in bezug auf den Wirkungseintritt, den Zeitpunkt der maximalen Wirkung und die Wirkungsdauer. Bei der i.v. Injektion tritt die Wirkung rasch ein, d.h. nach ungefähr 5-15 Minuten, sie klingt aber auch schnell wieder ab. Ein Nachlassen der Wirkung soll nach 1-2 Stunden eintreten, die Normalwerte sind nach 24 Stunden wieder erreicht. Das Wirkungsoptimum liegt zwischen 5-20 Minuten p.i.. Bei s.c. Injektion ist eine beginnende Wirkung erst nach 15-30 Minuten festzustellen, die maximale Wirkung ist nach 35-45 Minuten, die Normalwerte sind nach 60-65 Stunden erreicht. Für den Bedarfsfall wird eine kombinierte Injektion von je 1 Ampulle i.v. und s.c. empfohlen, um sowohl einen raschen Wirkungseintritt als auch eine lang anhaltende Wirkung zu erzielen.

Ähnlich wie bei der s.c. Verabreichung liegen die Verhältnisse bei der i.m. und s.m. Injektion.

Um klinisch experimentell einen Eindruck über die effektive Wirksamkeit des Präparates auf die Gerinnungsvorgänge zu bekommen, wurden verschiedene Untersuchungen durchge-

führt, die die Blutungs- und Gerinnungszeit, den Prothrombinverbrauch,die Thrombocytenzahl und einzelne Gerinnungsfaktoren betrafen. Die Ergebnisse sind keineswegs einheitlich. So schwanken die Werte der verschiedenen Autoren für die maximale Herabsetzung der Blutungszeit nach der Injektion von 1 Ampulle Reptilase zwischen 1/2, 1/3, 1/4, 1/5 und 1/6 des Ausgangswertes.Der Durchschnitt liegt zwischen 1/3 und 1/5. Die Art der Applikation, d.h. ob s.c. oder i.v., spielt dabei keine Rolle, da die Grenzwerte in beiden Fällen dieselben sind.

Auch die Gerinnungszeit wird stark verkürzt. Hier liegen die Werte bezüglich der optimalen Wirkung in einem begrenzteren Bereich, nämlich zwischen 1/2, 1/3 und 1/4 der Normalwerte. Die Bestimmung der Prothrombinwerte zeigte bei den meisten Verfassern eine Schwankung von nicht mehr als ± 4-5 %, was noch im Bereich der natürlichen Fehlergrenze der angewandten Methode liegt. S T A C H E R und B Ö H - N E L (36) stellten bei allen untersuchten Patienten ein leichtes Absinken des Prothrombins fest.Die Zahl der Thrombocyten blieb unverändert. F V und F VII waren nach den zuletzt genannten Autoren geringen Schwankungen unterworfen, was jedoch noch im Bereich der Fehlerbreite lag und daher nicht zu verwerten war.

Um den Effekt der Reptilase auf den Blutverlust bei Operationen zu untersuchen,arbeitete B R U C K (8) ein operatives Verfahren aus, das an ein und demselben Patienten in möglichst identischer Form und kurzem Zeitabstand zunächst

ohne und dann unter dem Einfluß des Haemostypticums ausgeführt wurde. Dieses Verfahren fand er in der Thiersch-Plastik. Seine Ergebnisse von an 16 Patienten ausgeführten Operationen zeigten eine Verminderung des Blutverlustes durchschnittlich auf weniger als ein Drittel nach Reptilase-Injektion.

Das Präparat wurde von fast allen Patienten sehr gut vertragen und zeigte keinerlei toxische Nebenwirkungen. Nur PICHA, ROCKENSCHAUß und WEGHAUPT (33) beobachteten bei einigen Frauen ihrer gynäkologischen Abteilung Nebenerscheinungen lokaler Natur, die darin bestanden, daß anschließend an die s.c. Injektion von der Injektionsstelle ausgehend ein leichtes Ziehen im Bein bemerkt wurde. Bei einer Frau sahen sie 2 Stunden p.i. am Orte des Einstichs eine leichte Schwellung und Rötung, die 12 Stunden anhielt. Thrombosen wurden nach Verabreichung von Reptilase nicht beobachtet. Auch gaben gleich bleibende Thrombocytenzahlen und Prothrombinwerte keinen Hinweis auf die Gefahr von Thrombose und Embolie.

PLISNIER (34) untersuchte die Toxizität der Haemokoagulase. Er fand, daß Tauben eine Dosis von 0,2 ccm vertragen, ohne Vergiftungserscheinungen zu zeigen. Das entspricht - auf das Körpergewicht bezogen - einer 400fachen therapeutischen Dosis für Erwachsene. Beim Kaninchen ist die tödliche Dosis - bestimmt bei langsamer intrajugulärer Injektion unter Kontrollierung des Herzstillstandes mit Hilfe oscillographischer Registrierung - bezogen auf kg

Körpergewicht ungefähr einer 700fachen menschlichen Dosis äquivalent.

Die Berichte über die Ergebnisse mit Reptilase sind nicht immer sehr kritisch, so daß den Versagern mindestens ebenso viel Bedeutung beigemessen werden muß wie den mit Erfolg behandelten Patienten. B R U C K und S A L E M (9) berichten von 2 Patienten, die nur auf s.c., nicht aber auf i.v. Applikation ansprachen. H E I S S (18) beobachtete in 3 von 50 Fällen eine vollkommene Wirkungslosigkeit des Präparates. Es handelte sich dabei um akute Blutungen bei Collum-Carcinom. G L A N I N G E R (15) fand bei von 30 systematisch untersuchten Fällen 5 Versager; 4 davon waren operierte und bestrahlte Larynx-Carcinome. B A U M G A R T N E R und T Y P L (1) erreichten bei 43 von insgesamt 52 Fällen chirurgisch-gynäkologischer Eingriffe einen guten, in 8 Fällen einen mäßigen und in 1 Fall überhaupt keinen Erfolg. Von 49 Fällen der konservativen Gynäkologie zeigte das Präparat bei 38 Patientinnen keinen therapeutischen Erfolg. Dabei handelte es sich in 37 Fällen um hormonelle Blutungen im Klimakterium.

Die Erfolge mit Reptilase bei Haemophilie sind sehr zweifelhaft. F L E I S C H H A C K E R (14) hat angeblich bei mehreren Haemophilen mit schweren Gelenkblutungen unter der Haemokoagulase-Therapie eine schnelle Rückbildung der Haemarthros erreicht. Bei haemophilen Kindern und Jugendlichen sollen 1 - 2 Reptilase-Injektionen pro Woche - über längere Zeit gegeben - das Auftreten neuer Gelenkblutungen

verhindern. D I X und S E L L A C H (12) konnten in 3 Fällen unstillbarer Blutungen nach Zahnextraktionen bei Haemophilie A mit dem Haemostypticum keine wesentliche Beeinflussung erreichen. Auch D E U T S C H (11) berichtet über die Wirkungslosigkeit des Schlangengiftpräparates bei Haemophilie.

# E I G E N E  U N T E R S U C H U N G E N

## Material:

1. Fibrinogen vom Rind, Behring-Werke. Es wurden 0,5-, 1- und 2%ige Fibrinogenlösungen verwandt.
2. Plasma und Blut vom Menschen und Kaninchen, das durch Citrat-, Oxalat- bzw Sequestren-Zusatz ungerinnbar gemacht wurde. Sequestren bindet Calcium fester als Citrat.
3. Calciumchlorid-Lösung, $^1/_{40}$ m.
4. Thrombokinase-Calcium-Lösung: 200 mg Thrombokinase-Trokkensubstanz, die im Labor von R. Marx aus Humanhirn hergestellt wird, wurden in 5 ccm isotonischer NaCl-Lösung suspendiert und in einem Wasserbad von 56°C 20 Minuten lang erhitzt. Die bei Zimmertemperatur abgesetzte und abgekühlte Lösung mischten wir mit m/40 $CaCl_2$ im Verhältnis 1 : 1.
5. Tachostyptan der Hormon-Chemie, München, - ein Thrombokinase-Präparat aus frischem Rinderhirn.
6. Thrombin: Test-Thrombin der Behring-Werke ist ein stabilisiertes Thrombinpräparat aus Rinderplasma. Die Stammlösung mit 60 E/ccm wurde weiter verdünnt.
7. Heparin und Heparinoide:
   a) Heparin-Novo der Novo-Industrie G.m.b.H. ist eine Lösung von Natrium-Mucoitinpolysulfat. Es enthält 50 mg/ccm.
   b) Heparinoid Geigy, 100 mg/ccm.
   c) SP 54 der bene-Chemie, München, ist Pentosanpolysul-

fosaures Natrium von einem Molekulargewicht um 2 000. 1 Ampulle enthält 100 mg.

d) Thrombocid ist ebenfalls Pentosanpolyschwefelsaures Natrium von einem Molekulargewicht um 3 000. In 1 ccm sind 50 mg enthalten.

e) Polyaethensulfosaures Natrium der Farbwerke Hoechst, 100 mg/ccm.

8. Hirudin: Wir stellten einen Speicheldrüsenextrakt von Hirudo selbst her, indem wir die Köpfe zweier Blutegel ganz fein in Seesand verrieben, dazu 2 ccm isotonische NaCl-Lösung gaben und die Suspension bei hoher Umdrehungszahl zentrifugierten. Wir erhielten die gebrauchsfertige Lösung durch Abgießen der Flüssigkeit vom Niederschlag.

9. Harnstoff-Lösung,6m. Es wurden 3,6 g Harnstoff in 10 ccm physiologischer NaCl gelöst.

10. Streptokinase: Streptase für diagnostische Zwecke der Behring-Werke ( 1 000 E/ml ) wird aus dem Kulturfiltrat β-hämolysierender Streptokokken der Lancefield-Gruppe C gewonnen.

## Methoden und Versuchsergebnisse:

### 1. Bestimmung der Recalzifizierungszeit unter Zugabe von Reptilase.

In ein Uhlenhuth-Röhrchen, das in den Rahmen eines Wasserbades von 37°C gesetzt ist, werden nacheinander 0,1 ccm Citratplasma, 0,1 ccm Reptilase verschiedener Konzentrationen bzw 0,1 ccm isotonische NaCl-Lösung im Leerversuch und 0,1 ccm m/40 $CaCl_2$-Lösung gegeben und dann der Zeitpunkt bestimmt, in dem bei Auf- und Abbewegen des Rührdrahtes der erste Fibrinfaden hängenbleibt.

Die Versuchsergebnisse sind in Tab. 1 wiedergegeben. Sie zeigen, daß sich die Recalzifizierungszeit bei Zugabe von konzentrierter Reptilase um mehr als die Hälfte des Leerwertes verkürzt. Bei zunehmender Verdünnung nähern sich die Werte allmählich dem des Leerversuches. Nennenswerte Verkürzungen sind nur bis zu einer Verdünnung von 1+10 zu beobachten. (Tab. 1 und Abb. 3)

| Reptilase-Verdünnungen | Recalzifizierungszeit (sec) |
|---|---|
| Leerversuch | 107 |
| konzentriert | 47 |
| 1+1 verdünnt | 63 |
| 1+2 " | 70 |
| 1+5 " | 81 |
| 1+10 " | 83 |
| 1+20 " | 90 |
| 1+50 " | 93 |
| 1+100 " | 97 |
| 1+200 " | 101 |

Tab.1: Recalzifizierungszeit von menschlichem Citratplasma ohne und mit Reptilase-Zusatz in Abhängigkeit von der Konzentration. Ansatz: 0,1 ml Citratplasma, 0,1 ml Reptilase bzw isot. NaCl im Leerversuch, 0,1 ml m/40 $CaCl_2$.

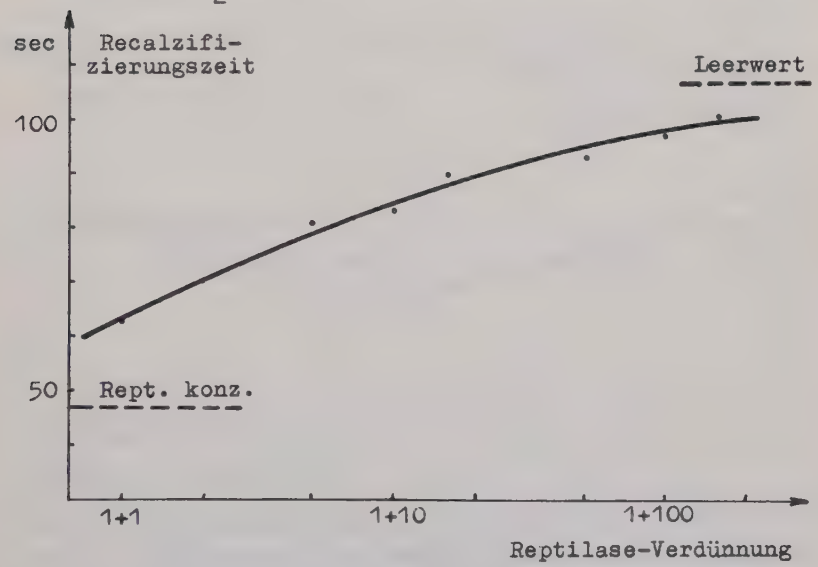


Abb.3: Die Kurve stellt die Verlängerung der Recalzifizierungszeit mit zunehmender Verdünnung der Reptilase dar.

## 2. Beeinflussung des Bothrops-jararaca-Gift-Präparates durch Tachostyptan.

Da bekannt ist, daß Tachostyptan die gerinnungsfördernde Wirkung des Russell-Vipern-Giftes steigert, untersuchten wir dieses Rinderhirnthrombokinase-Präparat daraufhin, ob es eine ähnliche Aktivierung der Reptilase bewirke. Wir bestimmten wiederum die Recalzifizierungszeit ( RZ ) unter gleichzeitigem Zusatz von unverdünnter Reptilase und Tachostyptan verschiedener Konzentrationen. Die Versuchsergebnisse ( Abb. 4 ) zeigen, daß die RZ nur geringfügig verkürzt wird, und daß Tachostyptan in konzentrierter Form sogar eine hemmende Wirkung auf das Schlangengiftpräparat ausübt.

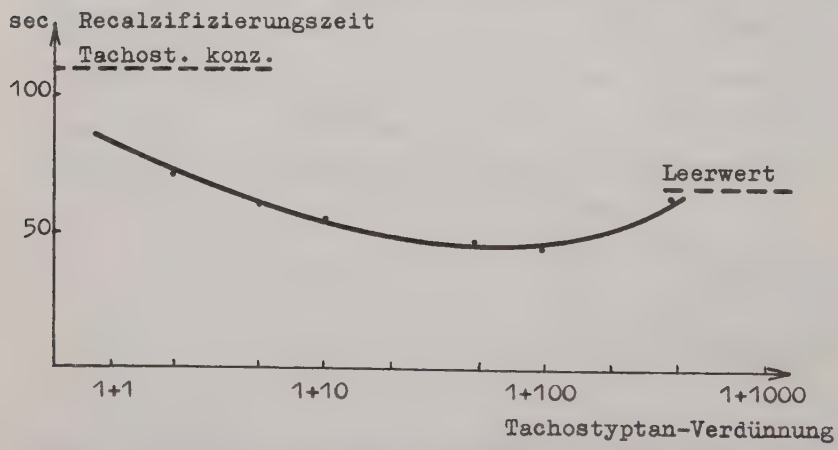


Abb.4: Recalzifizierungszeit von menschlichem Citratplasma unter Zusatz von Reptilase und Tachostyptan in Abhängigkeit von der Konzentration des letzteren. Ansatz: 0,1 ml Citratplasma, 0,05 ml Reptilase, 0,05 ml Tachostyptan verschiedener Konzentrationen bzw 0,05 ml isoton. NaCl im Leerversuch, 0,1 ml m/40 $CaCl_2$.

## 3. Untersuchung der Reptilase auf eine Faktor V - Wirkung.

Menschliches Oxalatplasma wurde 4 Wochen lang im Eisschrank gelagert, wodurch eine weitgehende Schädigung des Plasma-Akzelerins erreicht werden sollte. Nach dieser Zeit wurde die Einstufen-Prothrombinzeit dieses Plasmas unter Zusatz von Reptilase bestimmt. Die Versuchsergebnisse (Tab. 2) zeigen, daß die Reptilase die verlängerte Prothrombinzeit des gelagerten Oxalatplasmas nicht verkürzt.

| gelagertes Oxalatplasma (ml) | Aqua dest. (ml) | Reptilase (ml) | Thromboki-nase-$CaCl_2$ (ml) | Prothrom-binzeit (sec) |
|---|---|---|---|---|
| 0,1 | 0,1 | | 0,2 | 30,4 |
| 0,1 | | 0,1 | 0,2 | 31,2 |

Tab. 2: Bestimmung der Prothrombinzeit von gelagertem Oxalatplasma ohne und mit Reptilase-Zusatz.

4. Wirkung des Haemostaticums auf die II. Phase der Blutgerinnung und Bestimmung seiner Thrombinaktivität.

Die Frage, ob ein Stoff thrombinartig wirkt, läßt sich am besten entscheiden, indem man ihn zu Calcium-freiem Plasma sowie zu einer reinen Fibrinogenlösung gibt, die er im positiven Falle beide zur Gerinnung bringen muß. Wir bestimmten die Thrombinzeit, indem wir Citratplasma bzw eine 1%ige Fibrinogenlösung zu gleichen Teilen mit Reptilase versetzten und die Zeit bis zum Auftreten des ersten Fibrinfadens abstoppten. (Tab. 3) Anschließend verglichen wir das Ergebnis mit dem einer standardisierten Thrombinlösung und stellten dabei eine Aktivität der unverdünnten Reptilase fest, die der einer Thrombinkonzentration von ungefähr 1,5 NIH-Einheiten/ml entspricht.

| Citratplasma (ml) | 1%ige Fibrinogen-lsg (ml) | Reptilase (ml) | Thrombin-Lsg 1,5E/ml (ml) | Thrombinzeit (sec) |
|---|---|---|---|---|
| 0,2 | | 0,2 | | 97,5 |
| 0,2 | | | 0,2 | 90,0 |
| | 0,2 | 0,2 | | 110,0 |
| | 0,2 | | 0,2 | 34,0 |

Tab.3: Thrombinzeitbestimmung von menschlichem Citratplasma bzw einer 1%igen Fibrinogen-Lösung unter Zusatz von konz. Reptilase bzw einer dieser in ihrer Wirkung entsprechenden Thrombinlösung.

Auffallend ist die Thrombinzeitverkürzung bei reiner Fibrinogenlösung als Substrat durch eine auf Citratplasma in ihrer Aktivität der Reptilase entsprechenden Thrombinlösung.

## 5. Untersuchung einer Inaktivierung der Reptilase durch Thrombinhemmstoffe: Progressives Antithrombin, Heparin und Heparinoide, Hirudin.

Da sich die Reptilase Thrombin-ähnlich verhält, versuchten wir, sie durch Thrombininhibitoren zu inaktivieren.

Im menschlichen Plasma kommt eine gerinnungshemmende Substanz vor, die große Mengen Thrombin in kurzer Zeit wirkungslos macht. Wir fragten uns, ob auch Reptilase durch dieses sogenannte "progressive Antithrombin" ( =Antithrombin III) neutralisiert würde. Um diese Frage zu klären, machten wir folgenden Versuch:

Citratplasma wurde durch 5 Minuten langes Erhitzen bei 56°C und anschließendes Zentrifugieren bei hoher

| Inkubationszeit (min) | Fibrinogen 0,5%ig (ml) | defibriniertes Plasma - Thrombin(1,5E/ml) (ml) | defibriniertes Plasma - Reptilase (ml) | Thrombinzeit (sec) |
|---|---|---|---|---|
| 0 | 0,1 | 0,2 | | 90 |
| 1/2 | 0,1 | 0,2 | | 150 |
| 1 | 0,1 | 0,2 | | >1000 |
| 0 | 0,1 | | 0,2 | 115 |
| 1/2 | 0,1 | | 0,2 | 120 |
| 2 | 0,1 | | 0,2 | 115 |
| 5 | 0,1 | | 0,2 | 110 |
| 10 | 0,1 | | 0,2 | 110 |
| 20 | 0,1 | | 0,2 | 120 |

Tab.4: Thrombinzeitbestimmung einer 0,5%igen Fibrinogenlösung mit Thrombin bzw Reptilase, die in defibriniertem Plasma inkubiert sind.

Umdrehungszahl defibriniert und dann zu gleichen Teilen mit Reptilase bzw einer entsprechenden Thrombinlösung in einem Wasserbad von 37°C inkubiert. Die Wirkung dieser Gemische wurde in bestimmten Zeitabständen an einer 0,5 %igen Fibrinogenlösung getestet.

Die Ergebnisse der Antithrombinbestimmung sind in Tab.4 und Abb.5 dargestellt. Sie zeigen, daß die Reptilase durch progressives Antithrombin nicht inaktiviert wird, während eine Thrombinlösung gleicher Aktivität innerhalb 1 Minute praktisch völlig unwirksam gemacht wird.

Wir prüften weiterhin, ob Heparin oder Heparinoide das Haemostaticum in seiner Wirkung aufheben können. Untersucht wurden die Präparate: a) Heparin-Novo, b) Heparinoid - Geigy, c) SP 54, d) Thrombocid und e) Polyaethensulfosaures Natrium. Zu menschlichem Citratplasma gaben wir Heparin bzw Heparinoid in steigenden Konzentrationen, fügten nach kurzer Inkubationszeit Reptilase bzw Thrombin hinzu und bestimmten die Thrombinzeit. Das Ergebnis war in allen Fällen gleich: Niedrige Konzentrationen an γ-Heparin und Heparinoiden, die das Thrombin bereits inaktivierten, zeigten keine Wirkung auf die Reptilase. Konzentrationen zwischen 250 - 10 000 γ/ml förderten sogar die Thrombin-ähnliche Wirkung des Haemostaticums, und erst noch höhere Konzentrationen, die allerdings für therapeutische Zwecke uninteressant sind, ließen einen hemmenden Einfluß auf die Gerinnungszeit

| SP 54 ( /ml) | Thrombinzeit mit Thrombin (sec) | Thrombinzeit mit Reptilase (sec) |
|---|---|---|
| Leerversuch | 19,8 | 72,8 |
| 0,75 | 21,6 | 72,4 |
| 1 | 22,4 | 71,8 |
| 2,5 | 23,8 | 72,2 |
| 5 | 25,6 | 73,6 |
| 10 | 26,8 | 71,6 |
| 50 | 32,7 | 73,2 |
| 100 | 46,6 | 73,8 |
| 250 | 68,0 | 55,4 |
| 500 | 10 min | 46,8 |
| 1 000 | | 43,0 |
| 5 000 | | 51,2 |
| 10 000 | | 65,4 |
| 20 000 | | 77,6 |
| 50 000 | | 117,0 |
| 100 000 | | 211,0 |

Tab.5: Bestimmung der Thrombinzeit mit Thrombin bzw Reptilase unter der Einwirkung des Heparinoids SP 54 in verschiedenen Konzentrationen. Ansatz: 0,2 ml Citratplasma, 0,1 ml SP 54 bzw isoton. NaCl im Leerversuch, 0,2 ml Thrombin bzw Reptilase.

durch Reptilase erkennen. Als Beispiel sind in Tab. 5 die Ergebnisse mit dem Heparinoid SP 54 angeführt. Die Abb. 6 und 7 veranschaulichen die Verhältnisse am Beispiel des SP 54 und des Heparinoid-Geigy noch besser.

Als letztes prüften wir das gerinnungshemmende Prinzip aus dem Speicheldrüsensekret des Blutegels (Hirudin) auf eine die Reptilase inaktivierende Wirkung. Es wurden verschiedene Verdünnungen des - wie oben beschrie-

ben - gewonnenen Speicheldrüsenextraktes hergestellt und dann analog den vorangehenden Versuchen die Thrombinzeit von Citratplasma mit Reptilase und Thrombin unter der Einwirkung von Hirudin bestimmt.

Der Versuch ergab, daß nur die konzentrierte Form des Extraktes einen geringen hemmenden Einfluß auf das Haemostypticum ausübt. ( Abb. 8 )

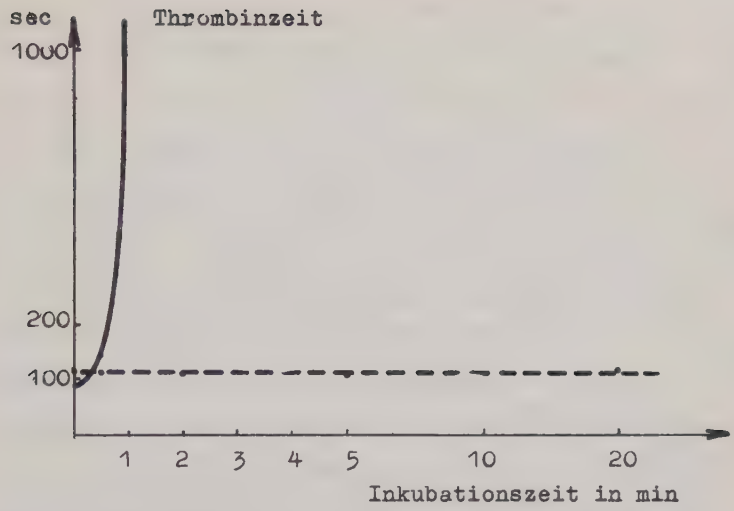


Abb.5: Inaktivierung von Reptilase und Thrombin entsprechender Konzentration durch defibriniertes Plasma. (——— = Thrombin, - - - - = Reptilase)

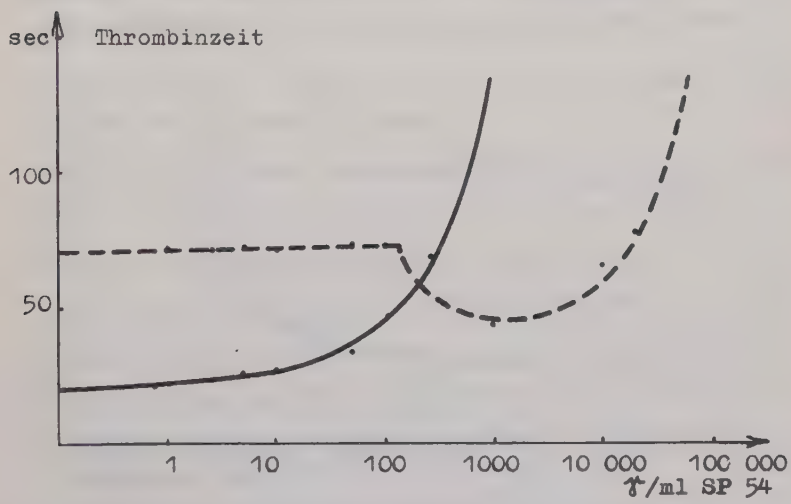


Abb.6: Inaktivierung von Thrombin und Reptilase durch das Heparinoid SP 54 in Abhängigkeit von der Konzentration. (——— = Thrombin, - - - - = Reptilase)

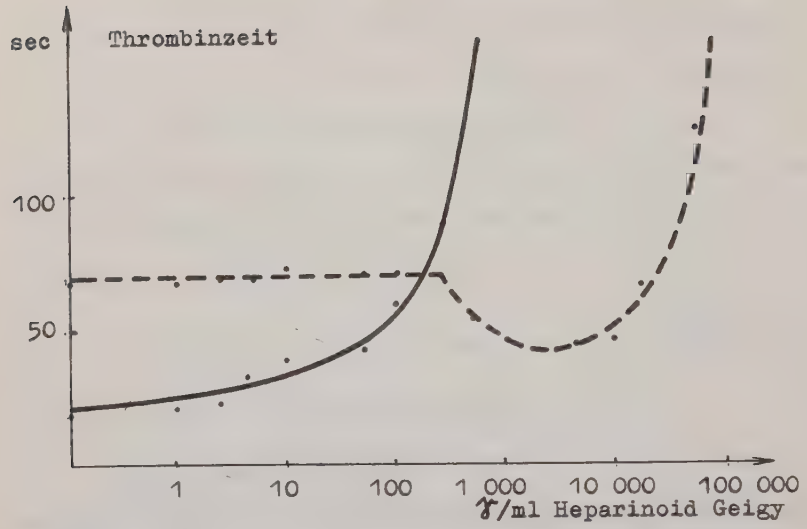


Abb.7: Inaktivierung von Thrombin und Reptilase durch das Heparinoid Geigy in Abhängigkeit von der Konzentration. (——— = Thrombin, - - - - = Reptilase)

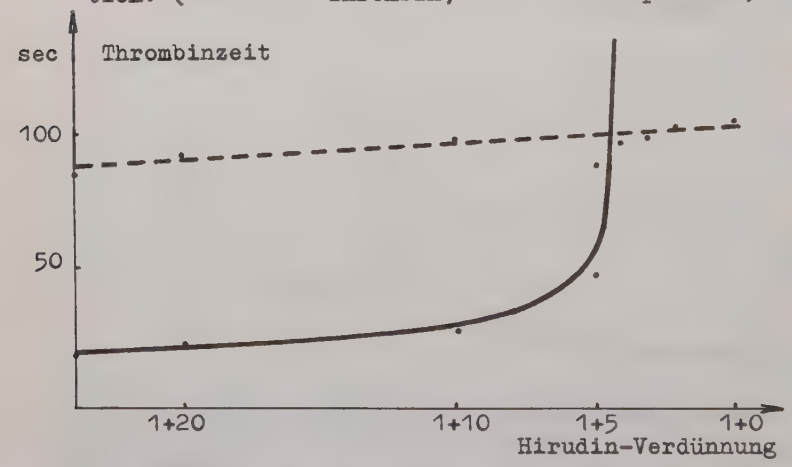


Abb.8: Inaktivierung von Thrombin und Reptilase durch Hirudin in Abhängigkeit von der Konzentration. (——— = Thrombin, - - - - = Reptilase)

6. Retraktion unter der Einwirkung der Haemokoagulase.

Für diesen Versuch änderten wir die Benthaus'sche Methode zur Bestimmung der Retraktion von Blutgerinnseln (2) in folgender Weise ab: In normale Reagenzgläser wurden nacheinander 4,3 ml isotonische NaCl-Lösung, 0,5 ml Citratplasma und zuletzt 0,2 ml Thrombin gegeben, das für die eine Versuchsreihe mit 0,9%iger NaCl, für die andere mit konzentrierter Reptilase gelöst und auf 10 NIH-E/ml verdünnt worden war. Das Ganze wurde durch Kippen über den Daumen gemischt. Nach eingetretener Gerinnung lösten wir die Gerinnsel von der Glaswand und stellten die Gläser in ein Wasserbad von 37°C. Nach 2 Stunden war die Retraktion fast vollständig. Die Volumina der unter der Einwirkung von Reptilase gebildeten und retrahierten Gerinnsel zeigten keinen Unterschied in ihrer Größe zu denen, die unter dem bloßen Einfluß von Thrombin entstanden waren.

Wir beobachteten auch die Retraktion von Gerinnseln, die allein durch Reptilase bzw eine Thrombinlösung entsprechender Aktivität gebildet worden waren. Die Gerinnung trat zwar später ein infolge der geringeren gerinnungsfördernden Wirkung, auch dauerte die Retraktion länger als gewöhnlich. Die Endwerte nach 24 Stunden waren jedoch in beiden Fällen gleich.

## 7. Löslichkeit der Reptilase-Gerinnsel in Harnstoff und Streptokinase.

Menschliches Citrat- und Sequestrenplasma wurde durch Thrombin bzw Reptilase zur Gerinnung gebracht und dann mit einer 6 m Harnstofflösung versetzt. Die durch das Schlangengift-Präparat gebildeten Gerinnsel ließen sich in Harnstoff wieder auflösen, ebenfalls die aus Sequestrenplasma durch Thrombin gebildeten, da der Fibrinstabilisierungsfaktor für seine volle Wirksamkeit Calcium benötigt. (Tab. 6)

| Citratplasma (ml) | Sequestrenplasma (ml) | Thrombin (ml) | Reptilase (ml) | Löslichkeit in Harnstoff |
|---|---|---|---|---|
| 0,2 | | 0,2 | | - |
| 0,2 | | | 0,2 | + |
| | 0,2 | 0,2 | | + |
| | 0,2 | | 0,2 | + |

Tab.6: Fibrinolyse von Thrombin- und Reptilase-Gerinnseln in 6 m Harnstofflösung.

Die Reptilase-Gerinnsel zeigten gleichfalls eine Löslichkeit durch Streptokinase. In einer ersten Versuchsreihe wurde die Streptokinase erst nach Bildung eines festen Thrombus zugegeben. Nach 24 Stunden war die Exolyse fast vollständig. Es war nur noch ein geringer Bodensatz übriggeblieben. In einer zweiten Versuchsreihe wurde die Streptokinase vor der Reptilase zu dem Plasma

zugegeben. Die Auflösung der entstandenen Gerinnsel trat erheblich schneller ein ,weil die Streptokinase in diesem Fall in dem Thrombus selbst vorhanden war und ihn von innen und von außen her auflösen konnte. Diese sogenannte Endolyse wurde durch Reptilase - verglichen mit Thrombin - bei niedrigen Streptase-Konzentrationen etwas verzögert.

8. Wirkung des Präparates auf die Thrombusfestigkeit.

In die Küvetten eines Hartertschen Thrombelastographen gaben wir Citratblut und setzten Reptilase bzw Thrombin in vergleichbarer und höherer Konzentration hinzu. Die aufgeschriebenen Kurven zeigten, daß die Reptilasemenge zu gering war, um überhaupt einen Ausschlag im Thrombelastogramm zu machen. Das durch eine gering konzentrierte Thrombinlösung (2 NIH/ml) gebildete Gerinnsel zeigte eine ausgesprochene Schlaffheit. Die Maximalamplitude ma war extrem niedrig. Vermutlich ist die geringe Thrombusfestigkeit durch einen zu kleinen Polymerisationsgrad der Fibrinmoleküle bedingt. Bei zu geringen Thrombinmengen soll es überhaupt nur noch zu einer Viskositätszunahme, nicht aber mehr zur Gerinnung kommen.

Bei Verwendung der zehnfachen Thrombinkonzentration entstand ein Thrombus von größerer Festigkeit. (Abb.9)

Als nächstes nahmen wir eine 2%ige Rinderfibrinogenlösung als Reaktionssubstrat und gaben sie zusammen mit Reptilase bzw Thrombin entsprechender Konzentration in den Thrombelastographen.Die Ergebnisse ließen erkennen, daß das Schlangengiftpräparat sowohl die Reaktionszeit r, das ist die Zeit bis zum Beginn der Gerinnung, als auch die Gerinnselbildungszeit k, das ist der Zeitabstand vom Ende der Reaktionszeit bis zum Auseinanderweichen der Kurvenschenkel um 2 cm, verlängerte. Auch die maximale Thrombuselastizität war erheblich geringer

als unter der Einwirkung von Thrombin. (Abb. 10)

Um den Einfluß des Präparates auf die Thrombusfestigkeit weiter zu untersuchen, lösten wir Thrombin in Reptilase und verdünnten es auch damit auf eine Konzentration von 30 NIH/ml. Diese Verdünnung gaben wir zusammen mit Citratblut wiederum in den Thrombelastographen. Zur Kontrolle machten wir den gleichen Versuch mit Thrombin, das mit physiologischer NaCl gelöst und verdünnt worden war. Die Kurven ließen eine deutliche Verkleinerung der maximalen Thrombuselastizität bei Verwendung der Reptilase als Lösungsmittel erkennen. (Abb. 11)

Machten wir jedoch den gleichen Versuch mit einer 2%-igen Fibrinogenlösung als Substrat, so konnten wir keine hemmende Wirkung der Reptilase auf den Gerinnungsvorgang und die Thrombusfestigkeit feststellen. Es kam im Gegenteil zu einer Vergrößerung der Maximalamplitude. Der gleiche Effekt trat auf, wenn wir der Fibrinogenlösung noch menschliche Thrombocyten zusetzten.

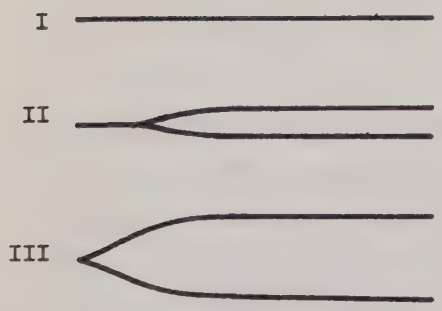


Abb.9: Thrombelastogramme, die unter der Einwirkung von Reptilase und Thrombin auf menschliches Citratblut entstanden. Küvettenfüllung: 0,2 ml Citratblut + 0,1 ml konzentrierte Reptilase(I) bzw 0,1 ml Thrombin, 2 NIH/ml (II) bzw 0,1 ml Thrombin, 20 NIH/ml (III).

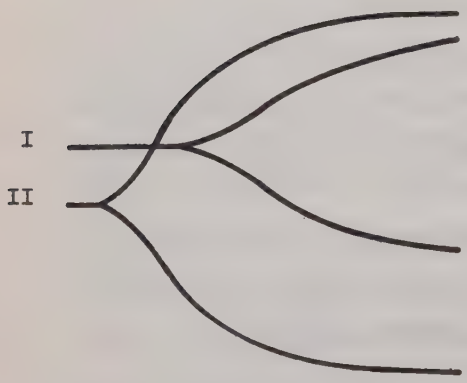


Abb.10: Thrombelastogramme, die unter der Einwirkung von Reptilase und Thrombin auf eine 2%ige Rinderfibrinogenlösung entstanden sind. Küvettenfüllung: 0,2 ml Fibrinogenlösung + 0,1 ml konzentrierte Reptilase (I) bzw Thrombin, 1,5 NIH/ml (II).

Abb.11: Thrombelastogramme, die unter der Einwirkung von Thrombin auf menschliches Citratblut entstanden sind. Das Thrombin wurde mit Reptilase (I) bzw physiol. NaCl (II) gelöst und verdünnt.

## 9. Beeinflussung der Thrombocytenevolution durch das Haemostaticum.

Nach der von M A R X und I B R O M (31) entwickelten Methode zur Untersuchung der Ausbreitung menschlicher Thrombocyten auf geeigneten Oberflächen gingen wir folgendermaßen vor:

Auf mit einer Zaponlackfolie überzogene Objektträger gaben wir 1 : 20 verdünntes normales Citratplasma ohne bzw mit Reptilase-Zusatz und legten diese für 1 Stunde in eine feuchte Kammer bei 20°C. Nach dieser Kontakt- und Ausbreitungszeit wurden die Zählkammern in einer NaCl-Lösung gespült, danach in Osmiumsäure fixiert und nochmals in aqua dest. gebadet. Dann wurden die ausgebreiteten Thrombocyten gezählt und in Beziehung gesetzt zu der vorher bestimmten normalen Thrombocytenzahl.

Wir konnten weder eine Förderung noch eine Hemmung der Thrombocytenevolution durch Reptilase feststellen. Auch auf die Klebrigkeit der Thrombocyten auf Zaponlackfolien hat die Reptilase keinen Einfluß. Der Adhärenzindex wurde durch sie nicht verändert.

## 10. Tierversuche.

Die Wirkung des Haemostaticums wurde auch im Tierversuch an Kaninchen analysiert. Wir spritzten den Tieren eine bzw mehrere Ampullen Reptilase in die Ohrvene und entnahmen vor, 5 und 30 Minuten nach der Injektion Blutproben zur Gerinnungszeitbestimmung. Die Versuche zeigten eindeutig, daß es p.i. zu einer Hyperkoagulabilität kommt. Das 5 und 30 min p.i. abgenommene Blut gerann trotz Citratzusatz nach 2-4 bzw 24 Stunden spontan. Selbst Zusatz von Sequestren konnte eine Spontangerinnung in vitro nicht verhindern, allerdings dauerte die Bildung eines festen Thrombus länger als bei Citratzusatz.

Die Prothrombinzeit war 5 min nach Injektion von 1 Ampulle Reptilase um $^1/_7$ ihres Ausgangswertes verkürzt, bei Injektion von 2 Ampullen um $^1/_5$. 30 min p.i. waren die Werte bereits wieder angestiegen. Auch die Thrombinzeit war nach i.v. Verabreichung des Schlangengiftpräparates verkürzt. Die Ergebnisse dürfen allerdings nicht überschätzt werden, da Kaninchen bei mehrmaliger Blutentnahme von mehreren ccm innerhalb kurzer Zeit mit einer starken Nativblut- und Plasmagerinnungszeitverkürzung reagieren - eine Erscheinung,die man als "Aderlasshypercoagulaemie" bezeichnet.

Weiterhin gaben wir von den ersten beiden Blutproben je 0,3 ml in eine Küvette des Thrombelastographen,setzten 0,06 ml m/40 $CaCl_2$ hinzu und registrierten r, k und

me der entstandenen Gerinnsel.Reaktions- und Gerinnselbildungszeit waren 5 min nach der Injektion von 1 Ampulle Reptilase stark abgesunken, die maximale Thrombuselastizität erhöht. (Abb. 12)

Eine Erhöhung der maximalen Thrombuselastizität kann folgende Ursachen haben:

1. eine Thrombocytenvermehrung,
2. eine Fibrinogenvermehrung,
3. eine erhöhte Klebrigkeit der Thrombocyten.

Daß die Reptilase keinen nachweisbaren Einfluß auf die Thrombocytenklebrigkeit hat, haben wir bereits oben erwähnt.

Zur Fibrinogenbestimmung nahmen wir Kaninchen Citratblut ab und zentrifugierten dieses scharf 15 Minuten lang. Von dem überstehenden Plasma gaben wir 1 ccm in ein Nissl'sches Fibrinröhrchen, erhitzten es 5 Minuten in einem Wasserbad bei 56°C und zentrifugierten anschließend nochmals bei hoher Umdrehungszahl.Dann konnten wir das ausgefällte Fibrin in Teitstrichen an der Röhrchenwand ablesen. Diese Hitzefibrinbestimmung führten wir vor und 5 Minuten nach der Applikation von 5 Ampullen Reptilase aus. Die Werte ergaben ein leichtes Absinken der Fibrinmenge, was durch die verhältnismäßig große Verdünnung des Blutes mit 5 ccm Flüssigkeit oder durch einen intravasalen Fibrinniederschlag erklärt werden kann.

Die Bestimmung der Thrombocytenzahlen in Citratblut

ließen einen deutlichen Anstieg während der ersten 5 Minuten nach der Injektion von 1 ccm Reptilase erkennen. Sie zeigten eine Erhöhung bis um ein Drittel des Ausgangswertes.

Damit hätten wir eine Erklärung für die Erhöhung der maximalen Thrombuselastizität nach Reptilase-Verabreichung beim Kaninchen gefunden.

Die Verträglichkeit des Haemostaticums scheint ziemlich groß zu sein. Wir spritzten als maximale Dosis einem Kaninchen 5 Ampullen des Präparates i.v., - das entspricht auf das Blutvolumen umgerechnet ungefähr der 100fachen therapeutischen Dosis für Erwachsene - ohne nachweisbare Symptome einer Thrombose oder Embolie oder Vergiftungserscheinungen festzustellen.

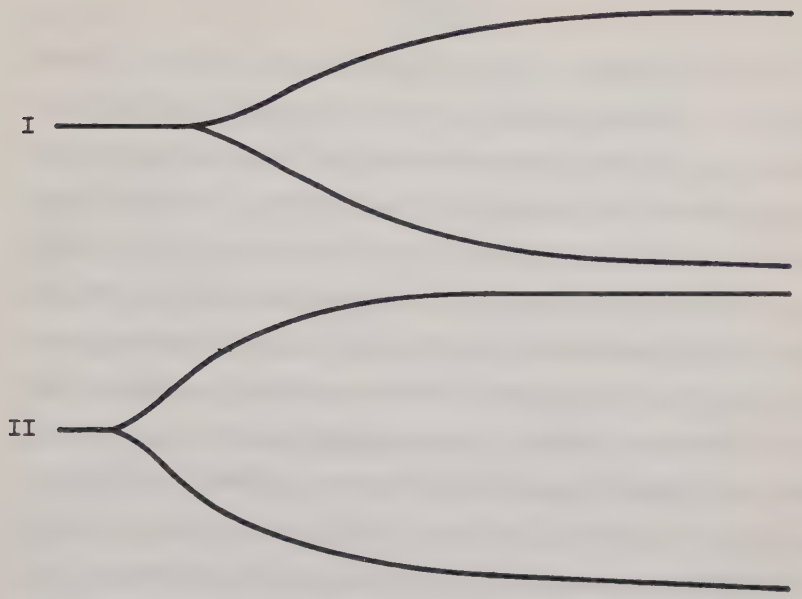


Abb.12: Thrombelastogramme vor (I) und 5 min nach (II) der Injektion von 1 Ampulle Reptilase. Küvettenfüllung: 0,3 ml Citratblut, 0,06 ml m/40 $CaCl_2$.

## Diskussion.

Die Untersuchungen ergaben,daß die Reptilase eine Thrombin-ähnliche Wirkung besitzt, weil sie sowohl Citratplasma ohne Calcium-Zusatz als auch gelagertes Oxalatplasma, Sequestrenplasma und reine Fibrinogenlösung zur Gerinnung bringt.Die Verkürzung der Recalzifizierungszeit von menschlichem Citratplasma durch die Haemokoagulase ist erheblich. Dieser Effekt kann möglicherweise auf einer Thrombokinase-ähnlichen oder Thrombokinase-aktivierenden Wirkung beruhen. Er kann aber auch allein durch das Eingreifen in die II. Phase der Blutgerinnung erklärt werden, indem das Präparat den Autokatalysekreis in Gang setzt und so wie Thrombin die Blutthrombokinasebildung aktiviert. Von Thrombin ist bekannt, daß es ebenfalls die Recalzifizierungszeit von Plasma verkürzt.

Eine Faktor V - Wirkung zeigt die Reptilase nicht, denn sie verbessert die verlängerte Einstufenprothrombinzeit von gelagertem Oxalatplasma nicht, wie man andernfalls erwarten würde. Nach einigen Autoren ist die Anwesenheit von Faktor V nötig, damit das Gift der Bothrops jararaca seine gerinnungsfördernde Wirkung überhaupt entfalten kann. Sie nehmen nämlich an, daß das Schlangengift zusammen mit F X, F V, Phospholipid und ionisiertem Calcium einen wirksamen Prothrombinaktivator bildet.

Die von uns getestete Charge des Praparates zeigte Citratplasma gegenüber eine Aktivität, die der einer Thrombinlösung von 1,5 NIH/ml entspricht. Eine Thrombinlösung

dieser Konzentration bringt jedoch eine reine Fibrinogenlösung viel schneller zur Gerinnung als unverdünnte Reptilase, was sich folgendermaßen erklären läßt: Thrombin wird im menschlichen Plasma durch progressives Antithrombin z.T. inaktiviert, während es an reiner Fibrinogenlösung seine volle Wirkung entfalten kann. Um die gleiche Gerinnungszeit zu erhalten, ist es also nötig, bei Verwendung von Plasma als Substrat höhere Thrombinkonzentrationen zu nehmen als bei Verwendung entsprechender Fibrinogenlösungen.

Das Haemostaticum verhält sich Thrombininhibitoren gegenüber indifferent. Sie wird weder durch progressives Serumantithrombin noch durch Heparin neutralisiert, - eine Tatsache, die die lang anhaltende Wirkung einer Reptilaseinjektion erklärt. Es scheint im Körper kein natürlicher Hemmstoff gegen das Schlangengiftpräparat vorhanden zu sein, der als Schutzmechanismus bei überschießendem Reaktionsablauf in Aktion treten könnte. Auch Heparinoide und Hirudin kommen als Antidot der Reptilase nicht in Frage, da man zu hohe Dosen injizieren müßte, um überhaupt eine gewisse hemmende Wirkung zu erzielen.

Die Retraktion von Blutgerinnseln, die an die Gegenwart morphologisch und funktionell intakter Blutplättchen gebunden ist, wird durch Reptilase nicht beeinträchtigt, wie zu erwarten gewesen wäre, wenn das Präparat eine pathologische Veränderung der Thrombocyten (Desintegration) hervorrufen würde. Die Gerinnung ist zwar bei Reptilase-Zusatz - verglichen mit einer Thrombinlösung - verlangsamt;

folglich setzt auch die Retraktion später ein und dauert länger. Die Endwerte der Retraktion liegen jedoch durchaus im Bereich der Norm.

Ein weiterer Unterschied zwischen der Thrombin- und Schlangengiftwirkung besteht darin,daß sich die Reptilase-Gerinnsel in Harnstoff wieder auflösen. Warum es zu dieser Fibrinolyse kommt, ist nicht ganz klar. Vermutlich handelt es sich um eine Störung des Fibrinstabilisierungsmechanismus. Wahrscheinlich spielt auch ein unterschiedlicher molekularer Aufbau des entstandenen Fibrinnetzes eine Rolle.

Die Löslichkeit der durch Reptilase gebildeten Gerinnsel durch Streptokinase könnte therapeutisch genutzt werden, falls nach Verabreichung des Präparates Thrombose- oder Embolieerscheinungen auftreten sollten.

Die geringe Konsistenz und Elastizität der Thromben, die in vitro unter der Einwirkung des Schlangengiftes aus Citratblut entstanden sind, können ebenfalls einen unterschiedlichen Vernetzungsvorgang oder eine starke Verlangsamung bzw Behinderung der Polymerisation zur Ursache haben. Ist die letztere zu stark, dann kommt es nur noch zur Ausbildung größerer Molekülkomplexe; eine echte Gerinnung findet nicht mehr statt. Auffallend ist die hemmende Wirkung der Reptilase auf die Thrombusfestigkeit, wenn wir sie als Lösungsmittel für Thrombin nehmen. Da diese negative Beeinflussung der maximalen Thrombuselastizität nur bei Verwendung von Plasma und nicht von Fibrinogen als Substrat auftritt, müssen wir annehmen, daß es sich um eine

Hemmung der I. Phase der Gerinnung handelt. Wie oben beschrieben enthält das native Giftdrüsensekret der Bothrops jararaca neben einer gerinnungsfördernden Komponente auch eine gerinnungshemmende. Möglicherweise war die von uns untersuchte Charge nicht genügend gereinigt,so daß gleichzeitig derart entgegengesetzt wirkende Bestandteile des Giftes in dem Präparat vorhanden waren.Die Hemmwirkung wurde jedoch z.T. durch die Thrombin-Ähnlichkeit der Haemokoagulase wieder kompensiert.

Reptilase verursacht nach i.v. Verabreichung eine Hyperkoagulabilität des Plasmas. Ihre Verträglichkeit scheint ziemlich groß zu sein, da sie lange Zeit im Blute kreist, ohne bisher erkennbare Symptome einer Thrombose oder Embolie hervorzurufen. Theoretisch besteht jedoch die Möglichkeit, daß es zur Bildung einzelner Fibrinfäden in den Gefäßen kommt, die in die verschiedenen Organe verschleppt werden und dort Mikroembolien machen. Durch den ständig in Bewegung gehaltenen Blutstrom könnte die Bildung größerer Gerinnsel wohl verhindert werden, aber trotzdem eine "Fibrination" erfolgen. Aus Tierversuchen mit Thrombinlösungen ist jedenfalls bekannt, daß sie eine feinflockige Fibringerinnung mit Defibrinierung und folgender Ungerinnbarkeit des Blutes infolge akuten Mangels an Fibrinogen verursachen.

Es wäre auch eine nötige Oberflächenaktivierung von Plasma zur Auslösung der Thrombin-ähnlichen Wirkung der Reptilase zu diskutieren, die eine in vitro-Gerinnung trotz Ci-

trat bzw Sequestrenzusatz nach i.v. Verabreichung des Präparates erklären würde, wenn es auch intravasal nicht zur Gerinnung kommt. Dies ist zunächst wenig wahrscheinlich.

Da die Reptilase in den Antithrombinen des Plasmas keine natürlichen Hemmstoffe hat, müssen wir annehmen, daß sie nur langsam abgebaut wird, vom RES abgefangen oder unverändert ausgeschieden wird.

Eine Identität der Reptilase mit Thrombin aus Blutplasma von Säugetieren kann anhand der Versuchsergebnisse ausgeschlossen werden. Da sie jedoch zumindest Thrombin-ähnlich wirkt und somit die mögliche Gefahr der intravasalen Gerinnung nicht ausgeschlossen werden kann, halten wir ihre Anwendung als Haemostaticum für sehr problematisch. Die lokale Verabreichung des Schlangengiftpräparates ist bei fast fehlender Einströmung in den Kreislauf besser begründet. So könnten Reptilase-Tampons bei einer durch Hirudin hervorgerufenen Gerinnungsverzögerung als Lokalhaemostypticum dienen, weil für diesen die Blutgerinnung hemmenden Stoff bisher noch kein Antidot bekannt ist. Ähnliches gilt von gerinnungshemmenden Substanzen anderer Blutsauger.

## Zusammenfassung.

In der vorliegenden Arbeit wird das Haemostaticum "Reptilase" untersucht. Es enthält die gerinnungsfördernden Komponenten aus den Giften zweier brasilianischer Ottern (Bothrops jararaca und Lachesis atrox).

Das "Bothropothrombin" greift wie das physiologische Gerinnungsferment in die II. Phase der Gerinnung ein: Es bringt Citratplasma und reine Fibrinogenlösung zur Koagulation.

Dagegen ließen sich aus den durchgeführten Testen dieser Untersuchung keine Hinweise auf eine Beeinflussung der I. Phase des Gerinnungsablaufes gewinnen.

Die Thrombinaktivität des Präparates "Reptilase" beträgt weniger als 1,5 NIH/ml.

Progressives Serumantithrombin und therapeutische Dosen an Heparin, Heparinoiden und Hirudin inaktivieren Reptilase nicht.

Die Retraktion verläuft unter dem Einfluß der Schlangengiftfraktionen normal.

Anders als Thrombin-Gerinnsel sind Reptilase-Gerinnsel in Harnstoff löslich. Auch Streptokinase verursacht eine Auflösung der durch Einwirkung von "Haemokoagulase" (Reptilase) entstandenen Thromben.

Die maximale Thrombuselastizität wird durch das Präparat nicht erhöht: Reptilase-Gerinnsel zeigen geradezu eine ausgesprochene Schlaffheit.

Die Verträglichkeit des Haemostypticums scheint sehr

groß zu sein, nachdem wir im Tierversuch am Kaninchen bei i.v. Injektion von 5 Ampullen/Tier keine Symptome einer Thrombose oder Embolie feststellen konnten.

Wir halten die parenterale therapeutische Anwendung der Reptilase für problematisch, die lokale aber bei Blutegelbissen bzw bei nachblutenden Stichen von Insekten und Zekken als Spezificum berechtigt.

Herrn Prof. Dr. R. Marx möchte ich für die freundliche Überlassung des Themas, für die Ermöglichung der Durchführung der Untersuchungen in seinem Labor und für die zahlreichen Anregungen während der Arbeit meinen herzlichen Dank aussprechen.

## Literaturverzeichnis

( 1) Baumgartner,H. und Typl,H.: Blutungen in der Gynäkologie. Wien. Med. Wschr. 48, 1 000, 1956.

( 2) Benthaus,J.: Eine Methode zur Bestimmung der Retraktion des Blutgerinnsels. Ärztl. Wschr., 619, 1953.

( 3) Blombäck,B.: Studies on the action of thrombic enzymes on bovine fibrinogen as measured by N-terminal analysis. Arkiv för Kemi, 12, 321, 1958.

( 4) Blombäck,B., Blombäck,M. und Nilsson,I. M.: Coagulation studies on "Reptilase", an extract of the venom from Bothrops jararaca. Thromb. Diath. haem., 1, 76, 1957.

( 5) Blombäck,B. und Laurent,T.: N-terminal and light-scattering studies on fibrinogen and its transformation to fibrin. Arkiv för Kemi, 12, 137,1958.

( 6) Blombäck,B. und Yamashina,I.: On the N-terminal amino acids in fibrinogen and fibrin. Arkiv för Kemi, 12, 299, 1958.

( 7) Brehms Tierleben, Standard - Verlag Hamburg 1954, Bd. XI, S. 339 - 343.

( 8) Bruck,H.: Über einen operativen Test zur Prüfung von Hämostyptica und die klinischen Erfahrungen mit "Reptilase" an einem großen Krankengut. Wien. klin. Wschr., 32, 571, 1957.

( 9) Bruck,H. und Salem,G.: Reptilase, ein Haemostypticum zur Prophylaxe und Therapie bei chirurgischen Eingriffen. Wien. klin. Wschr., 22, 395, 1954.

(10) Copley,A.L.: Neue Auffassungen über Haemorrhagie,Haemostase und Thrombose. Ärztl. Forsch., 11,114, 1957.

(11) Deutsch,E.: Blutgerinnungsfaktoren, Wien, Deuticke, 1955.

(12) Dix,J. und Sellach,J.: Zur Anwendung der Hämokoagulase-Klobusitzky (Reptilase) im Kiefer-Gesichtsbereich. DDZ-Das Deutsche Zahnärzteblatt, 21, 725, 1958.

(13) Eagle,H.: The coagulation of blood by snake venoms and its physiologic significance. J. exper. Med. 65, 613, 1937.

(14) Fleischhacker,H.: Zur Therapie der Gerinnungsstörungen. Wien. Med. Wschr., 9, 171, 1954.

(15) Glaninger,J.: Über die Verwendung des Haemostaticums Reptilase in der Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde. Monschr. für Ohrenheilkunde u. Laryngo-Rhinologie, 63, 1955.

(16) Grundmann,I.: Die Schlangengifte, ihre Pharmakologie, Toxikologie und ihre therapeutische Anwendung. Med. Mschr. 4, 570, 1950.

(17) Haupt,H.: Sofortmaßnahmen und gezielte Blutstillung bei Blutungskrankheiten der Neugeburtsperiode. Mschr. f. Kinderheilkunde, 108, 399, 1960.

(18) Heiss,H.: Ein Beitrag zur hämostatischen Therapie beim Kollum-Karzinom. Wien. Med. Wschr. 41,833, 1954.

(19) Heiss,H.: Zur hämostatischen Therapie in der operativen Gynäkologie und Geburtshilfe. Wien. Med. Wschr. 22, 512, 1956.

(20) Hohnen,H.W.: Experimentelle Studien zur Frage der Beeinflussung der Blutgerinnung durch Reptilase. Zs. f. d. ges. exp. Medizin, 4, 427, 1957.

(21) Holtz,P. und Raudonat,H.W.: Über die Beziehungen zwischen proteolytischer Aktivität und blutcoagulierender sowie bradykininfreisetzender Wirkung von Schlangengiften. Arch. exptl. Path. Pharm. 229, 113, 1956.

(22) Jürgens,R.: Pharmakologische Beeinflussung der Blutgerinnung. Arch. exptl. Path. Pharm. 222, 107, 1954.

(23) Kaiser,E. und Michl,H.: Die Biochemie der tierischen Gifte. Wien, Franz Deuticke, 1958.

(24) Keuth,U.: Zur Prophylaxe und Therapie der Blutungskrankheiten des Neu- und Frühgeborenen unter besonderer Berücksichtigung der intrakraniellen Blutungen. Mschr. f. Kinderheilk.,353,1959.

(25) v. Klobusitzky,D.: Gerinnungsfördernde und gerinnungshemmende Wirkung des Giftes der Bothrops jararaca. Wien. klin. Wschr. 14,276, 1940.

(26) v. Klobusitzky,D.: Gerinnungsfördernde und gerinnungshemmende Bestandteile der Schlangengifte. Klin. Medizin, 310, 1954.

(27) v. Klobusitzky,D.: Über die Neutralisation des gerinnungsfördernden Schlangengiftenzyms durch Heparin. Arch. exper. Path. 227,196, 1955.

(28) v. Klobusitzky,D.: Giftschlangen und Schlangengifte. Verlag R. Oldenbourg, München, 1960.

(29) v. Klobusitzky,D. und König,P.: Biochemische Studien über die Gifte der Schlangengattung Bothrops. III. Mitteilung: Die Trennung der gerinnungsfördernden Substanz von dem Bothropotoxin und den übrigen Sekretbestandteilen. Arch. exper. Path. u. Pharm. 181, 387, 1936.

(30) Luther,P. und Hauselt,F.: Neue Erkenntnisse zur Frage der Pathophysiologie und Therapie des Schädel-Hirn-Traumas. Med. Klinik 1, 20, 1961.

(31) Marx,R., Ibrom,H. und Stanislawski,F.: Die Färbung folien- und glasadhärenter,ausgebreiteter Thrombocyten. Ein Verfahren zur verbesserten lichtmikroskopischen Thrombocytenanalyse. Blut 4, 335, 1960.

(32) Nahas,L., Denson,K.W.E. und Macfarlane,R.G.: A study of the coagulant action of eight snake venoms. Thromb. Diath. haem. 12, 355, 1964.

(33) Picha,E., Rockenschaub,A. und Weghaupt, K.: Beitrag zur haemostatischen Behandlung in der operativen und konservativen Gynäkologie. Wien. med. Wschr. 3, 74, 1957.

(34) Plisnier,H.: Etude expérimentale au sujet de l'action des venins de Bothrops sur la coagulation sanguine. Bruxelles medical 35, 2167, 1955.

(35) Schill,R.: Erfahrungen bei Blutungen in einer Lungenabteilung - mit besonderer Berücksichtigung des Haemostaticums Reptilase. Wien. klin. Wschr. 28, 576, 1956.

(36) Stacher,A. und Böhnel,J.: Experimentelle und klinische Untersuchungen zur hämostatischen Wirkung von Schlangengiften. Wien. klin. Wschr. 19, 333, 1959.

(37) Stefan,H.: Pathogenese, Klinik und Therapie des Hirnblutungssyndroms. Haemostatische Wirkung von Schlangengiften - Reptilase. Konstitutionelle Medizin 7, 147, 1960.

## Lebenslauf

Am 18. August 1940 wurde ich als viertes Kind des Rechtsanwalts und Notars Dr. Ludwig Schoetzau und der Rechtsanwältin Dr. Eva Schoetzau, geb. Mager, in Hagen/Westf. geboren.

Ostern 1947 kam ich in die Volksschule, die ich 3 Jahre lang besuchte. Im März 1950 bestand ich die Aufnahmeprüfung am Hagener Neusprachlichen Mädchengymnasium (Ricarda - Huch - Schule). Nach 9-jährigem Besuch beendete ich dort meine Schulzeit mit der Reifeprüfung im Frühjahr 1959.

Im selben Jahr begann ich das Medizinstudium an der Universität Marburg, wo ich nach 2 Semestern im April 1960 das Vorphysikum ablegte. Nach weiteren 3 vorklinischen Semestern an der Universität Freiburg absolvierte ich dort das Physikum im Herbst 1961. Die klinischen Semester verbrachte ich an den Universitäten Innsbruck, Marburg und München. Nach Beendigung des Sommersemesters 1964 meldete ich mich zum Medizinischen Staatsexamen, das ich am 23. 2. 1965 an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München bestand.